

THESIS

MUNICH

1965

✓

**Untersuchungen über die Wirkung
von Phosphat-Ionen auf Atmung und Fruktolyse
von Spermien aus Nebenhodenschwanz
und Samenleiterampulle von Bullen**

Manfred Kleemann

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes BRÜGGEMANN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON
PHOSPHAT-IONEN AUF ATMUNG UND FRUKTOLYSE
VON SPERMIEN AUS NEBENHODENSCHWANZ UND
SAMENLEITERAMPULLE VON BÜLLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Manfred Kleemann
aus
Wassertrüdingen

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. L. KOTTER
Referent: Professor Dr. Dr. J. BRÜGGEMANN
Tag der Promotion: 26. Februar 1965

MEINER MUTTER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATUR	2
I. Der Weg der Spermien vom Nebenhoden zur Samenleiterampulle	2
II. Spermien und Sekrete im Nebenhoden und in der Samenleiterampulle	3
III. Der Spermienstoffwechsel	5
IV. Unterschiede zwischen Nebenhoden- und Ampullenspermien	6
C. METHODIK	11
I. Gewinnung der Spermien	11
II. Verdünnerlösungen und Nährlösung	11
III. Optische Kriterien zur Spermabeurteilung	12
IV. Atmung	13
V. Fruktolyse	14
VI. Phosphatbestimmung	20
VII. Fruktolyse bei verschiedener Wasserstoff- ionenkonzentration	21
VIII. Statistische Auswertung	22
D. ERGEBNISSE	23
I. Phosphatgrenzkonzentration im Hinblick auf die Hemmung des Pasteur-Effektes	23

II. Gehalt an Gesamtphosphat im Nebenhodenschwanz- und Ampullensperma	34
III. Fruktolyse bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration	35
E. DISKUSSION	37
F. ZUSAMMENFASSUNG	39
G. LITERATURVERZEICHNIS	40
LEBENS LAUF	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. EINLEITUNG

Seit dem Ende des zweiten Weltkrieges hat die künstliche Besamung in zunehmendem Maße an Bedeutung in der Tierzucht gewonnen. Mit ihrer raschen Ausbreitung erwies sich eine Intensivierung der Grundlagenforschung als erforderlich. Hier stellt die Biochemie des Spermas eine besondere Arbeitsrichtung dar.

Ein Arbeitsteam im Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München widmet sich in diesem Zusammenhang besonders der Frage der Stoffwechselaktivierung der Spermien im männlichen Genitaltrakt des Rindes.

Früher nahm man an, daß die Aktivierung des Spermienstoffwechsels erst nach dem Zufließen der Sekrete der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen während der Ejakulation erfolgt. Neue Arbeiten aus diesem Institut weisen jedoch darauf hin, daß eine Stoffwechselaktivierung der Spermien bereits während der Lagerung im Endabschnitt des Ductus deferens, der beim Rinde drüsig ausgebildeten Samenleiterampulle, zu beobachten ist.

Im Rahmen dieser Arbeiten übernahm ich die Experimentalaufgabe, in vitro die Einwirkung bestimmter Faktoren des Ampullenmilieus, insbesondere die Wirkung von Phosphationen, auf die Glykolyse von Nebenhodenschwanzspermien und Spermien aus der Samenleiterampulle zu prüfen.

B. LITERATUR

I. Der Weg der Spermien vom Nebenhoden zur Samenleiterampulle

Der Nebenhoden (Epididymis) lagert sich dem Hoden in dessen Längsrichtung dicht an. Er besteht aus Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda).

Das Caput epididymis besteht beim Rinde aus 13 - 15 Kanälchen (Ductuli efferentes), die sich zu durch Bindegewebe zusammengehaltene Läppchen (Lobuli) zusammenlegen. Durch die Vereinigung der Lobuli epididymidis entsteht der stark geschlängelte Nebenhodenkanal, der Corpus und Cauda epididymidis bildet. Beim Rinde erreicht der Nebenhodenkanal eine Länge von 40 - 50 m (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1960).

Der Samenleiter (Ductus deferens) stellt die Fortsetzung des Nebenhodenkanales dar. Er verläuft leicht geschlängelt an der medialen Seite des Nebenhodens zurück zum Caput epididymidis und weiter in die Bauchhöhle. Hier biegt er nach kaudal in die Beckenhöhle ein. Sein Endabschnitt verstärkt sich auf eine Länge von 13 - 15 cm (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1960), nach eigenen Feststellungen bei 1 1/2- bis 2jährigen Bullen auf einer Länge von 9 - 12 cm auf Bleistiftdicke. Er bildet so die Samenleiterampulle (Ampulla ductus deferentis). Ihr Mündungsabschnitt vereinigt sich mit dem Ausführungsgang der Glandula vesicularis (Vesikular-drüse) zum Ductus ejakulatorius, der von dorsal in die Harnröhre einmündet.

Die Samenleiterampulle ist beim Rinde drüsig ausgebildet. Man findet in der dicken Schleimhaut blasig erweiterte, verästelte Schlauchdrüsen. Ihr Sekret wird direkt in den Samenleiter abgegeben.

Der Samenleiter besitzt eine derb-muskulöse Wand. Seine Schleimhaut trägt ein ein- oder bisweilen zweistufiges Epithel. Die Verdickung des Endabschnittes des Ductus deferens ergibt sich aus dem Vorhandensein von Drüsen, sowie aus einer Verstärkung aller am histologischen Aufbau beteiligten Schichten.

II. Spermien und Sekrete im Nebenhoden und in der Samenleiterampulle

Im Nebenhoden (Epididymis) werden die aus dem Hoden kommenden Spermien gespeichert. Der Transport durch die geschlängelten Nebenhodengänge dauert mehrere Tage und erfolgt passiv durch Kontraktionen der muskulösen Wand des Nebenhodens. Diese Kontraktionen erfolgen im Abstand von 7 - 8 Sekunden und sind hormonell zu beeinflussen (RISLEY, TURBIFILL 1957). Die Spermienkonzentration im Nebenhoden ist - tierartlich verschieden - um ein Vielfaches höher als im Ejakulat. Auch einige hintereinander erfolgende Ejakulationen können diesen Spermienvorrat nicht erschöpfen. Die Spermien in ihrer Gesamtheit stellen im Nebenhoden eine weiß-gelbe, cremige Flüssigkeit dar. Für ihre Konzentration an Spermien liegen mehrere Angaben vor: BRANTON (1946) fand als Mittelwert von 10 Bullen $3,55 \pm 0,9 \times 10^9$ Spermien/ml. Nach BIALY (1959) ist der Gehalt an Spermien für beide Nebenhoden 18×10^9 . Nach eigenen Untersuchungen beträgt der Gehalt an Spermien im Nebenhodenschwanzsperma $36,98 \times 10^8$ /ml (Mittelwert aus 8 Versuchen).

Im Gegensatz zum Sekret der Ampulle enthält das des Nebenhodens fast keine Fruktose (MANN 1954). WHITE und WALES (1961) fanden beim Ziegenbock im Nebenhodensekret 10 ± 10 mg% Fruktose und 37 ± 10 mg% Milchsäure. MANN (1948) gibt im Ampullensekret von Bullen einen Fruktosegehalt von 179 mg% an.

Nach BRANTON (1946) befinden sich im Nebenhoden 78,1 - 85,6 mg% und in der Ampulle 81 - 94 mg% an reduzierenden Substanzen (Ascorbinsäure, Sulfit, Sulfhydrylverbindungen).

Nebenhodensekret enthält in hohen Konzentrationen Glycerylphosphorylcholin (GPC). WHITE und WALES (1961) fanden beim Ziegenbock 567 ± 338 mg%. SCOTT (1963) fand im Inhalt des Nebenhodenkopfes $497,5 \pm 41,6$ mg% und im Nebenhodenschwanz $2091,3 \pm 94,88$ mg% GPC. Im Ductus deferens fand er $1906,9 \pm 94,81$ mg% GPC. GPC wird nach SCOTT und Mitarbeitern (1963) im Nebenhoden gebildet. DAWSON, MANN und WHITE (1957) konnten keine Dephosphorylierung des GPC durch Spermien nachweisen und sind der Ansicht, daß es nicht am Stoffwechsel beteiligt ist.

Nach neueren Untersuchungen von WHITE (1964) wird es jedoch im weiblichen Genitaltrakt abgebaut.

KARG und GASSNER (1961) fanden im Ampullensekret von Bullen 8 - 16,6 mg% Ascorbinsäure. Nach GASSNER und HOPWOOD (1953) enthält Ampullensekret von Bullen Aminosäuren, insbesondere Alanin, Glycin und Glutaminsäure. Letztere Substanzen können von den Spermien zur Energielieferung herangezogen werden.

Gegenüber Temperaturschwankungen sind die Ampullenspermien viel empfindlicher als die Nebenhodenspermien. Kälteschockversuche mit Nebenhoden- und Ejakulatspermien des Ebers führte als erster LASLEY (1944) durch. Für eine Zeitdauer von 10 Minuten wurden die Spermien auf eine Temperatur von 0°C abgekühlt. Dabei überlebten 65 % der Nebenhodenspermien und nur 12 % der Ejakulatspermien. BIALY und SMITH (1959) ließen Nebenhodenspermien ein Ampullenpräparat passieren und unterwarfen die Spermien anschließend dem Kälteschock. Dabei waren die Nebenhodenspermien, welche die Ampulle passiert hatten, viel empfindlicher gegenüber dem Kälteschock geworden.

Die Motilität, das heißt die im Mikroskop sichtbare Vorwärtsbewegung der Spermien, ist bei Spermien aus dem Nebenhoden und der Ampulle ebenfalls verschieden. YOUNG (1929) untersuchte die Motilität von Nebenhodenspermien von Rind, Ziege und Meerschweinchen und konnte fast keine Motilität feststellen. Nach einem Versuch von BRANTON (1946) war die Motilität bei 50 Proben von Hodenspermien und bei 62 aus dem Nebenhodenhopf entnommenen Proben negativ. Im Corpus epididymidis fand er nur gelegentliche Spermienbewegung. Im Cauda epididymidis fand er in 51 % und in der Ampulle in 53 % der untersuchten Proben eine Motilität. SCHAMS (1964) fand bei Versuchen mit Nebenhodenschwanzspermien bei 90 % der Proben eine Vorwärtsbewegung von weniger als 5 % der Spermien. Ampullenspermien zeigten dagegen durchwegs eine Motilität von 60 - 70 %.

III. Der Spermienstoffwechsel

Die Spermien enthalten sehr wenig Protoplasma. Aus diesem Grund sind sie auf exogene Faktoren für den Energiegewinn angewiesen. Wie jede normale Zelle haben sie dazu zweierlei Möglichkeiten, sich ihre Energie für den Betriebsstoffwechsel zu sichern. Einmal die Atmung, zum andern die Glykolyse. Unter Atmung versteht man den aeroben Abbau der Kohlenhydrate zu H_2O und CO_2 . Unter anaeroben Bedingungen gewinnen die Spermien, wie jede Zelle, ihre Energie aus der Glykolyse, das heißt dem Abbau der Kohlenhydrate zu Milchsäure. Energetisch betrachtet ist dieser Weg wesentlich unrationeller, denn in der Milchsäure als Endprodukt ist noch Energie enthalten: Bei der Atmung werden 686 Kal/Mol Glukose frei, bei der Glykolyse jedoch nur 47 Kal/Mol Glukose.

Unter aeroben Bedingungen ist die Glykolyse erniedrigt. Diese hemmende Wirkung der Atmung auf die Glykolyse, die erstmals von Pasteur beobachtet wurde, wird als Pasteur-Effekt bezeichnet. Eine Hemmung des Pasteur-Effekts liegt dann vor, wenn die aerobe Glykolyse bei gleichbleibender Atmung erhöht ist.

MANN (1946) fand, daß als Hauptenergielieferant im Ejakulat d-Fruktose anzusehen ist. Die Fruktose stammt zum größten Teil aus der Glandula vesicularis, jedoch liefert auch die Samenleiterampulle einen Teil der Fruktose. Die Konzentration der Fruktose im Ejakulat schwankt beträchtlich, sie ist von der Testosteronproduktion abhängig.

Nach MANN (1954) nehmen Fermente der Glandula vesicularis und der Ampulle die Umwandlung der Glukose aus dem Blut in Fruktose vor.

Der Stoffwechsel der Spermien ist fast ausschließlich im Schwanz und Mittelstück lokalisiert (MANN 1957). Unter natürlichen Bedingungen gewinnen die Spermien die Energie aus der Glykolyse von Fruktose (anaerob). Jedoch können auch Glukose und Mannose *in vitro* verbraucht werden (REDENZ 1933). Nach LARDY, HANSEN und PHILLIPS (1945) verbrauchen Ejakulatspermien angebotene Maltose, Nebenhodenspermien vermögen jedoch diese nicht auszunutzen. Gewaschene Spermien, also Spermazellen, von welchen die Fruktose durch Waschen mit Ringerlösung oder phys. Kochsalzlösung und anschließendes Zentrifugieren oder Filtrieren entfernt

wurde, können sich unter anaeroben Bedingungen nicht bewegen. Unter aeroben Bedingungen jedoch sind sie infolge der endogenen Atmung in der Lage, sich gut zu bewegen. Das energieliefernde Substrat ist dabei nicht, wie LARDY und PHILLIPS (1941) glaubten, intrazelluläres Lecithin, sondern nach Versuchen von HARTREE und MANN (1954) Plasmalogen, eine Komponente der intrazellulären Lipide.

Nach MANN (1954) spielen sich beim Abbau der Fruktose die gleichen enzymatischen Vorgänge ab wie beim Kohlenhydratabbau im Muskel. Unter aeroben und anaeroben Bedingungen verläuft die Glykolyse bis zur Brenztraubensäure. Unter anaeroben Bedingungen reduziert DPN-H₂ (Diphosphopyridinnukleotid) Brenztraubensäure zu Milchsäure, während unter aeroben Bedingungen der weitere Abbau der Kohlenhydrate durch die Atmung zu CO₂ und H₂O über den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette erfolgt.

Als Maß für die Fruktolyse gibt MANN (1954) den Fruktolyseindex (FI) an, der die mg-Fruktose angibt, die von 10⁹ Spermien bei 37°C in einer Stunde verbraucht werden. Er beträgt bei Ejakulatspermien durchschnittlich 1,4 - 2.

IV. Unterschiede zwischen Nebenhoden- und Ampullenspermien

Nebenhoden- und Ampullenspermien stellen verschiedene Stadien in der Entwicklung der Spermien dar. Dies zeigt sich in verschiedenen meßbaren und sichtbaren Eigenschaften.

Rein optisch fällt die gute Beweglichkeit der Ampullenspermien auf. Wie bereits ausgeführt, ist die Beweglichkeit der Spermien aus dem Nebenhodenkopf gleich Null. Spermien aus dem Nebenhodenschwanz zeigen, wenn überhaupt, nur eine ganz geringe Bewegungsquote.

Nebenhodenspermien besitzen sehr häufig an ihrem Mittelstück ein gut sichtbares Bläschen, das als "Kinoplasmatischer Tropfen" bezeichnet wird.

Nach SALISBURY und BRANTON (1961) ist dieses Gebilde im Verlaufe der Spermienwanderung vom Nebenhoden über den Ductus deferens hin zur Ampulle immer seltener ausgeprägt. Die Lage dieses Bläschens verändert sich dabei vom proximalen Teil des Mittelstücks weiter nach distal.

Ampullenspermien sind gegenüber Umwelteinflüssen sehr viel empfindlicher als Nebenhodenspermien, wie bereits der Kälteschockversuch zeigte.

Interessante Unterschiede bestehen hinsichtlich der verschiedenen Stoffwechselleistungen. WALDSCHMIDT, KARG und SCHAMS (1963) fanden bei Ampullenspermien gegenüber Nebenhodenspermien eine erhöhte endogene Atmung und eine erhöhte aerobe Fruktolyse und Milchsäurebildung. In dieser Hinsicht stehen die Ampullenspermien damit bereits auf der Stufe der Ejakulatspermien. BRÜGGEMANN, WALDSCHMIDT, KARG und SCHAMS (1963) erhielten in Fortführung dieser Versuche folgende Ergebnisse: Nebenhodenschwanzspermien (NHS-Sp.) sind gegenüber Hypotonie unempfindlicher als Ampullenspermien (AS), deren Atmung, aerobe und anaerobe Glykolyse in hypotonischer (0,6%) gegenüber isotonischer Kochsalzlösung deutlich herabgesetzt sind. Inkubation mit Ampullensekret steigert bei Nebenhodenschwanzspermien die Empfindlichkeit gegen hypotonische Lösungen. Nach Inkubation mit Ampullensekret ist ein signifikanter Hemmeffekt hypotonischer Kochsalzlösung auf die Atmung zu beobachten. Die Glykolyse von NHS-Sp. konnte durch Inkubation mit Ampullensekret in vitro jedoch nicht regelmäßig, wie es in vivo bei der Weiterentwicklung der NHS-Sp. zu AS zu beobachten ist, gesteigert werden.

Die von LARDY, GOSH und PLAUT (1949) für Ejakulatspermien berichtete Hemmung des Pasteur-Effektes ist bereits bei Ampullenspermien ausgeprägt.

Zur Frage der die Reifung bedingenden Faktoren liegen mehrere Veröffentlichungen vor. Nach LARDY, GOSH und PLAUT (1949) existiert ein Stoffwechselregulator, der die Reifung bewirkt. Er soll erst bei der Ejakulation wirksam werden. Bei längerer Lagerung der NH-Sp. (in vivo in der Samenleiterampulle) soll dieser Stoffwechselregulator ebenfalls wirksam werden, so daß sich Stoffwechselleistungen von gelagerten NH-Sp. und von Ejakulatspermien vergleichen lassen. Eine nähere Beschreibung des Stoffwechselregulators gibt LARDY noch nicht. Er vergleicht die Wirkung mit der des Dinitrophenols, das die Glykolyse der Spermien bei konstan-

ter Atmung erhöht. Damit steigert der Regulator den Stoffwechsel, verringert aber gleichzeitig die Energieausnutzung.

In einer späteren Arbeit beschreibt LARDY (1953) den Schwefelwasserstoff als Stoffwechselregulator und Reifungsfaktor. GOSH und LARDY (1952) hatten Schwefel in den Spermien festgestellt, der von Hefezellen zu H_2S reduziert wird, das auf Hefezellen atmungsstimulierend wirkt. Zusatz von H_2S und Na_2S zu Nebenhodenspermien steigert die aerobe Glykolyse, ohne die Atmung zu hemmen und bewirkt damit eine echte Hemmung des Pasteur-Effektes.

RÖDEL (1955) nahm in Versuchen, die am hiesigen Institut durchgeführt wurden, die Frage nach dem "Reifungsfaktor" H_2S LARDYS (1953) wieder auf. Es gelang, ein Ferment nachzuweisen, das aus Cystein H_2S abzuspalten vermag. Nach WALDSCHMIDT (unveröffentlichte Versuche) ist die Aktivität dieser Cysteindesulhydrase jedoch zu niedrig, um den in vivo beobachteten Effekt zu erklären, zumal die Cysteinkonzentration im Ampullensekret sehr niedrig ist.

DE GROOT (1961) untersuchte nach den Kriterien "Motilität" und "Lebend-Tot-Färbung" Spermien von Erst- und Zweitejakulaten von Bullen. Auf Grund der Versuchsergebnisse nahm er an, daß die Spermien von Ejakulat zu Ejakulat zuerst aus der Samenleiterampulle und dann aus den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens kommen. Er glaubte auf ein fortschreitendes Altern bereits innerhalb des Nebenhodens schließen zu können.

BONADONNA (1955) bezeichnet die Färbbarkeit der Spermien nach Gram als Indikator für Reifung und Alter. Nach seinen Versuchen sind NH-Sp. Gram-negativ, Ejakulatspermien Gram-positiv.

SALISBURY (1957) sieht die Reifung unter dem Gesichtspunkt der Verschiebung der osmotischen Verhältnisse der Spermien von Nebenhoden bis zum Ejakulationsstadium. Durch eine Verschiebung des Mineralgleichgewichtes soll die Permeabilität der Spermienmembran geändert werden. Energieliefernde Substanzen wie Sauerstoff oder Kohlenhydrate aus der Glandula vesicularis können dann vom Spermium aufgenommen werden. Dies hat fortschreitende Motilität und Steigerung des Stoffwechsels zur Folge.

LARDY und Mitarbeiter (1949) sprechen von Stoffwechselaktivierung im Zusammenhang mit der Hemmung des Pasteur-Effektes bei Ejakulatspermien und bezeichnen diese dann als "gereift". Wie bereits beschriebene Versuche an hiesigem Institut zeigen, besitzen bereits Ampullenspermien eine erhöhte aerobe Glykolyse. Auch im Hinblick auf die erhöhte endogene Atmung und die Motilität stehen Ampullenspermien auf der Stufe der Ejakulatspermien.

Die Stoffwechselaktivierung findet also in der Samenleiterampulle statt. Es handelt sich um eine Stoffwechselumstellung, da bei gleichbleibender Atmung die Glykolyse erhöht ist. Durch dieses "Reifungskriterium" nach LARDY ergibt sich infolge des gehemmten Pasteur-Effekts ein weniger rationeller Stoffwechsel. Dies bedeutet einen Rückschritt im Sinne einer weniger ökonomischen Energieausnutzung. (Es sei darauf hingewiesen, daß auch die Tumorzelle als Stoffwechselcharakteristikum eine Hemmung des Pasteur-Effektes aufweist). Die Samenleiterampulle ist deshalb nicht nur als der Ort für die Stoffwechselaktivierung, sondern auch für das Altern der Spermien aufzufassen. (Siehe dazu S. 12 DE GROOT (1961), S. 13 BONADONNA (1955), S. 6 BIALY und SMITH (1959), LASLEY (1944)). Dies geht vor allem auch aus Versuchen von LEIDL und BERCHTOLD (1961) hervor, nach welchen lebende Spermien in der Ampulle über einen längeren Zeitraum nur gefunden werden, wenn die Verbindung zum Hoden erhalten ist, wenn also stets "frische" Spermien aus dem Nebenhoden in die Ampulle nachdrängen. Die Lebensfrist der Spermien in der Ampulle ist also knapp bemessen. Als Initiator für die Stoffwechselaktivierung in der Samenleiterampulle werden Stoffe diskutiert, die im Sekret der Ampulle vorhanden sind. Eine andere Möglichkeit der Stoffwechselaktivierung wäre denkbar durch die Erhöhung der endogenen Atmung der Spermien, die durch die Veränderung der Permeabilität der Spermienwand erreicht wird. Das Fruktosevorkommen in der Ampulle ist dann lediglich eine notwendige Vorbedingung für die Stoffwechselaktivierung. Nach Versuchen von BRÜGGEMANN und Mitarb. (1963) an hiesigem Institut hatte ein Gemisch aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin, Glykokoll, Serin und Asparaginsäure, sowie Ascorbinsäure und Ca- und Mg-Ionen (in jeweils im Ampullensekret vorkommender Konzentration) keinen Einfluß auf den Stoffwechsel von NHS-Spermien. Natriumsulfit steigert zwar in der Konzentration von 10^{-3} M die Glykolyse auf 220 - 280 % des Normalwertes in 0,9 % NaCl-Lösung, senkt jedoch die Atmung auf nahezu 75 % der Norm. Bei Stoffwechseluntersuchungen unter Zusatz von Natriumsulfit lag die wirksa-

ne Konzentration in vitro etwa um den Faktor 100 höher als die tatsächlich im Ampullensekret gefundene Konzentration. Als spezifische Hemmstoffe des Pasteur-Effektes wurden jedoch das Sulfid-Ion und das Phosphat-Ion erkannt. Die Konzentration des Sulfid-Ions im Ampullensperma liegt aber unter der Nachweisgrenze, die wirksame Konzentration in vitro liegt bei 10^{-3} m. Das Phosphat-Ion kann bereits im Nebenhoden nachgewiesen werden und kommt dort in ähnlicher Konzentration wie in der Ampulle vor.

Bisher ist allein das Phosphat-Ion im Nebenhodenschwanz- und Ampullensperma als Faktor bekannt geworden, der in physiologischer Konzentration, ohne die Atmung zu beeinflussen, die Glykolyse steigert und über diese Hemmung des Pasteur-Effektes dem von LARDY postuliertem "Reifungskriterium" gerecht wird.

Diese von BRÜGGEMANN und Mitarbeitern (1963) erhobenen Befunde bedurften noch einer systematischen Abklärung im Hinblick auf die wirksamen Phosphat-Konzentrationen. Die nachfolgend wiedergegebenen eigenen Versuche sind diesen Problemen gewidmet.

C. METHODIK

I. Gewinnung der Spermien

Das Untersuchungsmaterial stammte aus dem Schlachthof in München.

Samenleiterampullen und Nebenhoden wurden jeweils von den gleichen Bullen entnommen. Das Alter der Schlachttiere betrug ungefähr eineinhalb Jahre. Es handelte sich vornehmlich um Höhenfleckvieh. Die Organe wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen und umgehend zur weiteren Behandlung ins Labor transportiert.

Im Labor wurden die Nebenhoden von den sie umgebenden Schichten abpräpariert. Kleine, verbleibende Blutgefäße zwischen den Windungen des Nebenhodens wurden ebenfalls vorsichtig entfernt. Es wurden nur Spermien aus dem Schwanzteil des Nebenhodens zur Untersuchung herangezogen. Die so präparierten Schwanzteile der Nebenhoden wurden dann in physiologische Kochsalzlösung kleingeschnitten. Nach 5 - 10 Minuten waren die Spermien in die Kochsalzlösung ausgewandert und konnten durch einen Glasfiltriertrichter abgesehen werden. Die Samenleiterampullen wurden vom sie umgebenden lockeren Bindegewebe abpräpariert und vorsichtig ausgedrückt. Ein nur schwaches Ausdrücken ist ratsam, weil man dann relativ wenig tote Spermien erhält. Aus dem gleichen Grunde mußte schädliche Kälteeinwirkung, zum Beispiel durch Luftzug, ferngehalten werden.

II. Verdünnerlösungen und Nährlösung

1. Phys. Kochsalzlösung:

Gefrierpunktniedrigung $\Delta FP = 0,56^{\circ}$

0,9 g NaCl ad 100 ml Aqua dest.

2. Isotonischer Phosphatpuffer $\Delta FP = 0,56^{\circ}$

pH 7,2

a) 0,5 m Lösungen

6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aq. dest. +
8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aq. dest.

b) Gebrauchsfertiger Puffer (0,125 m)

37,2 ml 0,5 m Na_2HPO_4 ad 200 ml Aq. dest.
12,8 ml 0,5 m NaH_2PO_4

3. Als Nährsubstrat wurde für die Spermien, entsprechend den Verhältnissen in vivo, Fruktose im Überschuß zugesetzt. Es wurden 0,1 Volumteile einer Lösung von 500 mg% Fruktose in phys. Kochsalzlosung zu der Spermien suspension zugegeben. Die Fruktosekonzentration im Verdünnermilieu der Spermien betrug also 50 mg%. Ampullensperma und Nebenhodensperma wurden nach Bestimmung der Spermiedichte mit obigen Lösungen so weit verdünnt, daß sich in 1 ml der Sperma verdünnung $1,5 \times 10^8$ Spermien befanden.

4. Zählung der Spermien

Die Abtötung der Spermien erfolgte durch Verdünnung des Spermas mit Hayem'scher Lösung in einer Mischpipette. Die Auszählung erfolgte in der Zählkammer nach Thoma-Zeiß.

III. Optische Kriterien zur Sperma beurteilung

1. Motilität

Es wurde nur die Vorwärtsbewegung bestimmt, Ortsbewegung und Massenbewegung blieben unberücksichtigt. Die Beurteilung erfolgte subjektiv mit Hilfe eines Heitzischmikroskopes bei 37°C . Die Angabe der Vorwärtsbewegung erfolgte in Prozent der Gesamtmenge der Spermien.

2. Bestimmung der lebenden Spermien

Sie erfolgte im Ausstrichverfahren mit Bromphenolblau in Anlehnung an Erfahrungen von LEIDL (persönliche Mitteilung).

Ein Tropfen der Spermien suspension und ein Tropfen der Bromphenolblau Lösung wurden vorsichtig vermischt. Der Ausstrich erfolgte auf einem Objektträger. Anschließend wurde der Ausstrich bei 37°C getrocknet.

Lebende Spermien sind nicht angefärbt, dagegen sind die Köpfe toter Sper-

mien blau gefärbt. Etwa 5% der Spermien stellen eine Übergangsform dar. Dabei ist der kaudale Kopfteil angefärbt, der kraniale nicht. Diese Formen sind zu den toten Spermien zu zählen, nach SWANSON und BEARDEN (1951) sind sie unmittelbar vor der Anfärbung abgestorben. Die Kopfkappe setzt dabei dem Farbstoff noch einen gewissen Widerstand entgegen.

Das Prinzip der Färbemethode beruht auf einer erhöhten Permeabilität der Membran toter Spermien.

Herstellung der Farblösung:

Bromphenolblau 0,7 g, Natriumcitrat 3,0 g ad 100 ml Aqua dest.

Bei der Auszählung wurde darauf geachtet, daß die Spermien an verschiedenen Stellen des Ausstriches erfaßt wurden. Es wurden jeweils 100 Spermien gezählt und ausgewertet.

IV. Atmung

Die Messung des Sauerstoffverbrauches erfolgte mittels der manometrischen Methode nach WARBURG (1919).

In das innere Behältnis der Warburg-Kölbchen wurden je 0,3 ml 30% NaOH pipettiert; zur Oberflächenvergrößerung wurde ein Papierfähnchen in die NaOH gestellt. Die NaOH absorbiert das entstehende CO_2 . Anschließend wurden die Kölbchen mit je 3,0 ml der Spermien suspension besetzt und am Warburg-Manometer befestigt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde lang bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 100/Min.

Jeder Ansatz bestand aus drei Werten mit je 3,0 ml der zu untersuchenden Spermaverdünnung und drei Blindwerten mit je 3,0 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Proben wurden zuerst 15 Min. lang zum Temperaturausgleich mit geöffneten Hähnen am Manometer in das Inkubationsbad verbracht. Dann wurde eine Stunde lang inkubiert. Die Ablesungen am Manometer erfolgten im Abstände von 10 Min. Vor Beginn jeder Ablesung mußte der linke Schenkel der Manometer von neuem auf die Eichmarke eingestellt werden, um das Volumen in den Warburg-Kölbchen konstant zu halten.

Durch den Sauerstoffverbrauch der Spermien bei der Respiration entsteht im

Manometer ein Unterdruck. Unter Berücksichtigung der Kolbchenkonstanten wird dieser in $\mu\text{Mol O}_2$ umgerechnet.

Um Abweichungen von der gewünschten Spermienkonzentration $1,8 \times 10^8$ erfassen zu können, wurde die Spermienzahl jedes zur Respiration angesetzten Hauptwerts anschließend durch Zählung (s. II, 4) ermittelt. Der Mittelwert aus je drei Hauptwerten wurde zur Berechnung herangezogen.

V. Fruktolyse

1. Ansatz

Ein Ansatz zur Messung der Fruktolyse bestand aus zwei Blindwerten, zwei aeroben und zwei anaeroben Proben, die jeweils 1 ml der Spermasuspension enthielten. Um anaerobe Verhältnisse im Kolbchen schaffen zu können, wurde durch die entsprechenden Proben vor der Inkubation $6\frac{1}{2}$ Min. lang durch einen auf $170 - 180^\circ$ geheizten Kupferturm hochgereinigter Stickstoff geleitet. Unmittelbar vor Beginn der Inkubation wurden die beiden Blindproben durch Zugabe von je 4,0 ml Aqua dest. gefällt und die Spermien abzentrifugiert. Eine Eiweißfällung mit Trichloressigsäure war nicht notwendig, da fast kein Eiweiß vorhanden war, und das Verfahren durch den Wegfall der Neutralisation vor der Milchsäurebestimmung vereinfacht war.

Die aeroben und anaeroben Parallelproben wurden eine Stunde lang bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 100/Min. im Warburg-Apparat inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Glykolyse durch Zugabe von je 4,0 ml H_2O zu den einzelnen Proben beendet, und die Spermien sogleich abzentrifugiert.

2. Fruktose-Bestimmung

Je 1,0 ml des Überstandes wurde zur Fruktose-Bestimmung nach MANN (1948) herangezogen.

Prinzip: Erhitzen mit Salzsäure ergibt aus der Fruktose eine Wasserabspaltung.

Es entsteht Oxymethylfurfurol. Dieses bildet mit Resorcin einen roten Farb-

komplex, der kolorimetrisch bestimmt wird. Die Auswertung der Bestimmung erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit einer Fruktoselösung bekannter Konzentration aufgestellt wird. Zu 1,0 ml Überstand (s. S. 14) wird 1,0 ml Aqua dest. pipettiert. Dazu 2,0 ml einer 0,1% alkoholischen Lösung von Resorcin und 6,0 ml 30% HCl. Die Proben werden gut durchmischt und anschließend 10 Min. im Wasserbad von 80 - 85°C erhitzt und nach Abkühlung kolorimetrisch gemessen. Die Messung erfolgt gegen Aqua dest. als Blindwert im Eppendorf-Photometer bei 509 m μ (Filter Cd 509) und 2 cm Schichttiefe. Die gemessene Extinktion wird über die Fruktose-Eichkurve in μ Mol Fruktose umgerechnet. Um Schwankungen in der Konzentration der HCl und der Art der Erhitzung erfassen zu können, wurde die Fruktose-Eichkurve für jeden Versuch neu erstellt.

Eichlösung: 18 mg d(+)-Fruktose (0,1 μ Mol) in 100 ml Aqua dest. Davon werden 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 ml zur Erstellung der Eichkurve verwendet.

3. Milchsäurebestimmung

0,5 ml des Überstandes (s. S. 14) wurden zur Bestimmung des Milchsäuregehalts nach BARKER und SUMMERSON (1941) herangezogen.

Prinzip: Milchsäure reagiert mit konzentrierter Schwefelsäure zu Acetaldehyd.

Zugabe von p-Oxybiphenyl ergibt einen blauen Farbkomplex, der kolorimetrisch bestimmt wird.

Die Berechnung erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit bekannten Mengen Milchsäure aufgestellt wird. 0,5 ml des Überstandes werden in einen Mischzylinder pipettiert. Dazu 1,0 ml 20% Kupfersulfatlösung und 3,5 ml Aqua dest. In diese Lösung wird etwa 1 g Ca(OH)₂ verbracht, anschließend wird gut durchmischt. Die Proben werden etwa 1/2 Std. lang unter gelegentlichem Durchschütteln stehen gelassen: $\text{Cu}^{++} + 2 \text{OH}^- \rightarrow \text{Cu(OH)}_2$. Das tiefblaue Kupferhydroxyd hat die Aufgabe, störende Verunreinigungen zu adsorbieren.

Anschließend werden die Proben zweimal abzentrifugiert. Von dem so erhaltenen Überstand werden je 1,0 ml in zwei Reagenzgläser pipettiert (Doppelbestimmung), die 0,05 ml 4% Kupfersulfat enthalten, 6,0 ml konzentrierte Schwefelsäure werden unter Eiskühlung vorsichtig zugegeben. Nach guter Durchmischung werden die Proben 5 Min. lang ins kochende

Wasserbad verbracht. Dabei baut die konzentrierte H_2SO_4 die Milchsäure zu Acetaldehyd ab. Nach Abkühlung unter 20°C erfolgt die Zugabe von 0,05 ml 1,5% p-Oxybiphenyllosung (in 0,5% NaOH). Es wird sofort und sehr gründlich durchgeschüttelt. Die Proben werden dann 30 Min. in einem Wasserbad von $25 - 30^\circ\text{C}$ stehen gelassen, in dieser Zeit wird noch zweimal gut durchgeschüttelt. Dann werden die Proben 30 Sek. lang in ein kochendes Wasserbad gestellt, wodurch überschüssiges p-Oxybiphenyl zerstört wird.

Nach Abkühlung erfolgt die kolorimetrische Messung im Eppendorf-Photometer gegen Aqua dest. als Blindwert bei 546 m μ (Filter Hg 546) und 1 cm Schichttiefe.

Die gemessene Extinktion wird über eine Eichkurve zur Berechnung der Milchsäurebildung herangezogen.

Beispiel zur Berechnung der Atmung

Der Versuch wurde mit Ampullenstermien in phys. NaCl-Lösung und isotonischem Phosphatpuffer pH 7,2 20% (in phys. NaCl) durchgeführt.

$$K_{O_2} = \text{Kölbchenkonstante} = \frac{V_{\text{gas kor.}}}{10} = V_{\text{Kölbchen}} + V_{\text{Manometer}} - V_{\text{flüssig}} \times \frac{273^{\circ}\text{C}}{310^{\circ}\text{C}}$$

Da die Manometer mit Brodielösung gefüllt sind, bei der eine Säule von 10 m einen Druck von 1 Atm. ausübt, ergibt sich bei Multiplikation der Differenz des Manometerstandes (Δp) in mm mit 1/10 des auf Normalbedingungen korrigierten Gasvolumens in ml direkt die Volumänderung in μl .

Probe	Amp. in NaCl			Amp. in 20% PO ₄			Blindwerte		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
KO ₂	1,140	1,143	1,140	1,120	1,116	1,114	1,081	1,267	1,165
O'	150	149,5	149,5	150	150,5	150,5	149	149	150
10'	133,5	133,5	135	133	134	137	149,5	149,5	150
20'	108	109,5	106,5	118,5	122	122,5	148	151	152,5
30'	95,5	96,5	94,5	104	103	105,5	150	152,5	152,5
40'	77	77,5	74,5	92	93,5	92,5	150	154	153
50'	58	58,5	56,0	74,5	73,5	76	152	154,5	154
60'	40	40,5	38,5	60	58,5	62,5	153,5	155	155,5
ul O ₂ /Std. = px KO ₂	125,4	124,4	126,6	100,8	102,7	98,0	4,5	6,0	5,5
Mittel der 3 Parallelbestimmungen		125,5			100,5			5,3	
kor. um Blindwert		130,8			105,8				
u Mol O ₂ /Std.		5,81			4,72				
Anzahl Spermien									
Mittel aus 3 Zählungen		1,80 x 10 ⁸			1,85 x 10 ⁸				
u Mol O ₂									
10 ⁸ Sp. x Std.		1,077			0,851				

Beispiele für die Berechnung von Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung

Fruktolyse von Amp. Spermien in isot. Phosphatpuffer 1% (in phys. NaCl)

a) Fruktoseverbrauch

Probe	Extinktion 509 mu, 2 cm	μMol Fruktose aus der Eichkurve	μMol verbraucht	μMol gesamt	μMol 10^8 Sp.
1 Blindwert	0,545	0,844	-	4,220	-
2 "	0,545				
3 aerob	0,430	0,661	0,915	3,305	0,458
4 "	0,431				
5 anaerob	0,243	0,366	2,390	1,830	1,196
6 "	0,238				

b) Milchsäurebildung

Probe	Ext. 546 mu, 1 cm	Mittel	$\mu\text{Mol MS}$ aus d. Eichkurve	μMol gesamt	μMol verbraucht	$\frac{\mu\text{Mol}}{10^8 \text{ Sp.}}$	$\frac{\text{MS}}{\text{Frukt.}}$
1 Blindw.	0,262	0,262	0,163	1,63	-	-	
	0,264						
2 "	0,264						
	0,260						
3 aerob	0,382	0,384	0,254	2,54	0,91	0,454	
	0,382						
4 "	0,386						
	0,386						
5 anaerob	0,665	0,666	0,486	4,86	3,23	1,616	1,35
	0,664						
6 "	0,668						
	0,667						

VI. Phosphatbestimmung

Bestimmt wurde das "Gesamtphosphat" im Ampullen- und NHS-Sperma. Es ist aus verschiedenen Fraktionen zusammengesetzt, wie stabiles Phosphat (Hexose-6-phosphat, Pentose-3- und 5-phosphat, Pyrophosphorsäure), labiles Phosphat (Adenosintriphosphorsäure, Adenosindiphosphorsäure, Fruktose-1-phosphat, Fruktose-1,6-diphosphat), extralabiles Phosphat (Phosphokreatin, 1,3-Diphosphoglyzerinsäure) und freie PO_4 -Ionen.

Gewinnung des Spermas:

Das Ampullensperma wurde mit der bereits beschriebenen Methode durch vorsichtiges Ausdrücken der Samenleiterampulle gewonnen.

Die Spermien aus dem Nebenhodenschwanz konnten nicht durch Kleinschneiden und Abgießen gewonnen werden, da dabei Gewebssaft der NH-Kanälchen mit in das Sperma gelangen und die Phosphatbestimmung verfälschen. Um dies zu vermeiden, wurden die Schwanzteile der NH in der früher beschriebenen Weise freipräpariert, desgleichen die ersten cm des Ductus deferens. Dieser wurde nach 5 - 6 cm abgeschnitten. In das so geschaffene freie Ende des Ductus deferens wurde eine stumpfe Kanüle eingeführt und eine mit phys. Kochsalzlösung gefüllte Spritze aufgesetzt. Durch die injizierte Kochsalzlösung entsteht ein Überdruck im NHS und das NHS-Sperma wird durch die nachdrängende NaCl-Lösung immer wieder kranial gepreßt, bis es an der Schnittfläche zum NH-Körper aus dem NHS austritt. Da zwischen der NaCl-Lösung und dem NHS-Inhalt eine Luftblase verbleibt, kann man auf diese Art reines NHS-Sperma gewinnen.

Phosphatbestimmung nach FISKE und SUBBAROW (1928) aus "Methods in Enzymology" Bd. III S. 840:

Zu 0,1 ml Sperma wurden 0,9 ml Aqua dest. pipettiert. Nach Durchmischung wurde die Spermien suspension mit 1,0 ml 10% Trichloressigsäure gefällt und anschließend abzentrifugiert. Zu 1,0 ml des Überstandes wurde 1,0 ml 5n H_2SO_4 pipettiert, sodann wurde der Reagenzglasinhalt über freier Flamme eingengt bis braune Farbe auftrat. Anschließend wurden 1 - 2 Tropfen 2n HNO_3 zugegeben und erhitzt bis weiße Dämpfe entstanden. Alle HNO_3 muß abgedampft werden. Nach Abkühlung erfolgte die Zugabe von 1,0 ml Aqua dest. Anschließend kamen die Reagenzgläser

(es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt) 5 Min. ins siedende Wasserbad. Nach Abkühlung wurden jeweils nacheinander zugegeben: 2,0 ml Aqua dest., 5 ml Isobutanol-Benzol 1 : 1, 0,5 ml 10% Ammoniummolybdat, 0,5 ml 10n H_2SO_4 . Anschließend wurde 15 Sek. kräftig geschüttelt, damit sich der gebildete Phosphorammoniummolybdänsäure-Komplex im Isobutanol-Benzol-Gemisch löste. 2,0 ml aus oberer Schicht wurden mit 4,0 ml H_2SO_4 -Alkohol (32 ml konz. H_2SO_4 gelöst in 968 ml absol. Äthanol) versetzt und kräftig durchgeschüttelt. Dann erfolgte die Zugabe von 0,5 ml einer 200fach verdünnten SnCl_2 -Lösung (10 g $\text{SnCl}_2 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ gelöst in 25 ml konz. HCl). Anschließend erfolgte die kolorimetrische Messung am Eppendorf-Photometer mit Küvetten von 2 cm Schichtdicke und bei 578 m μ gegen Aqua dest. als Nullwert.

Anhand einer Eichkurve wurde die gemessene Extinktion in $\gamma\text{P/ml}$ umgerechnet.

VII. Fruktolyse bei verschiedener Wasserstoffionen- konzentration

Um die Wirkung gleicher Phosphationenkonzentration auf die Fruktolyse bei verschiedenem pH prüfen zu können, wurden Versuche mit NHS-Sp. bei pH 6,0 und 6,5 durchgeführt. Der pH-Wert im NHS-Sperma beträgt 5,8 - 6,3, im Ampullenmilieu ist er geringfügig niedriger.

Herstellung des Phosphatpuffers pH 6,0 (siehe RAUEN, Literaturverzeichnis):

Es wurden 7,4 ml 0,5 m Na_2HPO_4 mit 0,5 m NaH_2PO_4 auf 50 ml aufgefüllt, Aqua dest. ad 200 ml.

Herstellung des Phosphatpuffers pH 6,5: 18,0 ml 0,5 m Na_2HPO_4 mit 0,5 m NaH_2PO_4 ad 50 ml, Aqua dest. ad 200 ml.

Herstellung der 0,5 m-Lösungen:

6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aqua dest.

8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aqua dest.

Die Spermien wurden durch Durchspülen des NHS mit phys. Kochsalzlösung gewonnen. Sie wurden mit 2,8% Phosphatpuffer (errechnet sich aus: 0,125 m,

das ist die isotonische Konzentration, und $0,0035\text{ m}$, das ist die durchschnittliche molare Konzentration der Phosphationen im Nebenhodenschwanz) in phys. NaCl auf $1,8 \times 10^8\text{ Sp./ml}$ verdünnt. Der Fruktosezusatz war wie in früheren Versuchen $50\text{ mg\%}$ (die Dichte wurde ebenfalls wieder auf $1,8 \times 10^8\text{ Sp./ml}$ eingestellt).

Die einzelnen Wasserstoffionenkonzentrationen wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

Die Parallelansätze in reiner phys. Kochsalzlosung wurden mit HCl bzw. NaOH auf pH 6,0 bzw. 6,5 eingestellt.

Die Messung des pH erfolgte jeweils mit der Glaselektrode.

Um ein Absinken des pH zu vermeiden, wurde die Spermiesuspension so lange als möglich bis zu dem Beginn der Inkubation in Eis gestellt. Aus dem gleichen Grunde wurde nur 20 Min. bei 37°C im Warburg-Apparat inkubiert.

Der weitere Versuchsverlauf, Messung von Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung erfolgte wie bereits beschrieben.

VIII. Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der Meßergebnisse wurden Spermien-Atmung und Fruktolyse unter verschiedenen Inkubationsbedingungen verglichen.

Die Signifikanz der Differenzen wurde mit dem Wilcoxon-Test geprüft (VAN DER WAERDEN 1957, GEIGY 1960) und zwar je nach Versuchsansatz im Stichprobenvergleich oder im Paarvergleich.

Als gesichert wurden Unterschiede mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von $2\alpha < 0,05$ bezeichnet.

D. ERGEBNISSE

I. Phosphatgrenzkonzentration im Hinblick auf die Hemmung des Pasteur-Effektes

1. Atmung

In Tabelle 1 und 2 sind die Ergebnisse des Einflusses der Phosphationenkonzentration auf die Atmung von Nebenhodenschwanz- und Ampullenspermien zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß erst ein Zusatz von 20% Phosphat (in phys. Kochsalzlösung) eine signifikante Erniedrigung der Atmung herbeiführt. Das entspricht einer molaren Konzentration von $2,5 \times 10^{-2} \text{ m}$. Als Kontrolle dienten Parallelansätze in reiner phys. Kochsalzlösung. Die wirksame Konzentration für die Beeinflussung der Atmung ist mit etwa 20% Phosphatzusatz für Nebenhodenschwanz- und Ampullenspermien gleich. In orientierenden Untersuchungen konnte bei 15% Phosphatzusatz noch keine Atmungserniedrigung festgestellt werden, so daß die Grenzkonzentration zwischen 16 und 20% liegen dürfte.

Bei 20% Phosphatzusatz betrug die Erniedrigung des Sauerstoffverbrauches 15% für NHS-Spermien und 20% für Ampullenspermien.

Tabelle 1

Sauerstoffverbrauch von Ampullenspermien in phys. Kochsalzlösung und verschiedenen Zusätzen von isotonischem Phosphatpuffer zu phys. Kochsalzlösung

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

phys. NaCl-Lösung (Kontrollansatz)	1 %	2 %	10 %	20 %	25 %	30 %
0,52	0,60					
1,03		1,01				
0,82			0,79			
0,78			0,76			
0,86				0,71		
0,70				0,56		
0,82				0,63		
0,73				0,63		
1,08				0,85		
1,08					0,84	
1,08						0,68
0,96						0,67

Tabelle 2

Sauerstoffverbrauch von NHS-Spermien in phys. Kochsalzlösung und verschiedenen
Zusätzen von isotonischem Phosphatpuffer in phys. Kochsalzlösung

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

phys. NaCl-Lösung (Kontrollansatz)	1 %	2 %	Anteil von Phosphatpuffer in phys. NaCl-Lösung	10 %	20 %	25 %	30 %
0,84	0,86						
0,57	0,52						
0,52	0,49						
0,63		0,65					
0,95		1,04					
0,87				0,84			
0,96				0,97			
1,01					0,93		
0,64					0,51		
0,89					0,78		
0,87					0,73		
0,99					0,87		
0,69					0,52		
0,99						0,86	
0,99							0,81

2. Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung

Aus den Tabellen 3 - 8 ist zu entnehmen, daß bei 0,5% Phosphat (in phys. NaCl-Lösung) noch kein Effekt erzielt werden konnte. Aber bereits ein Zusatz von 1% Phosphat (in phys. NaCl-Lösung) bewirkte eine Steigerung der Fruktolyse zu den Ansätzen in reiner phys. NaCl-Lösung, das entspricht einer molaren Konzentration von $1,25 \times 10^{-3}$.

Bei NHS-Spermien stieg unter diesen Bedingungen der aerobe Fruktoseverbrauch um 110%, der anaerobe Fruktoseverbrauch und die aerobe Milchsäurebildung um 70 - 80%, und die anaerobe Milchsäurebildung um 60%.

Bei Ampullenspermien erhöhte sich der aerobe und der anaerobe Fruktoseverbrauch, sowie die anaerobe Milchsäurebildung um 75 - 85%, die aerobe Milchsäurebildung sogar um 120%.

Tabelle 3
Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von NHS-Spermien in phys. Kochsalzlösung

lebende Spermien %	Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml					
	Fructoseverbrauch		Milchsäurebildung		Fructose-	Milchsäure-
	aerob	anaerob	aerob	anaerob	quotient	quotient
85	0,13	0,42	0,22	0,61	3,22	2,97
78	0,22	0,63	0,21	0,88	2,88	4,30
70	0,17	0,37	0,21	0,46	2,26	2,19
75	0,32	0,72	0,42	1,23	2,27	2,94
80	0,16	0,63	0,26	0,88	4,07	3,35
75	0,22	0,42	0,34	0,88	1,91	2,00
Mittelwerte	0,20	0,53	0,27	0,82	2,77	2,96

Tabelle 4

Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von Ampullenspermien in phys. Kochsalzlösung

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

lebende Spermien %	Motili- tät %	Fructoseverbrauch aerob	Fructoseverbrauch anaerob	Milchsäurebildung aerob	Milchsäurebildung anaerob	Fructose quotient	Milchsäure- quotient
73	50	0,33	0,66	0,44	0,94	1,99	2,15
79	40	0,21	0,46	0,30	0,78	2,17	2,58
78	40	0,26	0,73	0,37	0,98	2,82	3,71
72	60	0,31	0,76	0,42	0,94	2,43	2,23
82	60	0,15	0,29	0,18	0,32	1,88	1,83
76	50	0,28	0,58	0,28	0,70	2,11	2,80
Mittelwerte		0,26	0,58	0,27	0,81	2,23	2,55

Tabelle 5

Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung von NHS-Spermien in phys. Kochsalzlösung
unter Zusatz von 0,5% isot. Phosphatpuffer

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

lebende Spermien %	Fruktoseverbrauch		Milchsäurebildung		Fruktose- quotient	Milchsäure- quotient
	aerob	anaerob	aerob	anaerob		
85	0,14	0,44	0,26	0,68	3,08	2,63
78	0,21	0,64	0,21	1,12	3,04	5,27
70	0,12	0,37	0,19	0,41	3,03	2,16
75	0,29	0,74	0,31	1,17	2,53	3,76
80	0,15	0,65	0,26	0,96	4,36	3,69
75	0,23	0,42	0,38	0,72	1,82	1,90
Mittelwerte	0,19	0,54	0,27	0,84	2,98	3,24

Tabelle 6

Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von Ampullenspermien in phys. Kochsalzlosung
unter Zusatz von 0,5% isot. Phosphatpuffer

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

lebende Spermien %	Motili- tät %	aerob	anaerob	aerob	anaerob	Fructose - quotient	Milchsäure - quotient
79	40	0,22	0,46	0,33	0,74	2,07	2,24
70	50	0,24	0,64	0,26	1,01	2,70	3,88
71	40	0,25	0,65	0,36	0,96	2,60	4,21
75	60	0,32	0,78	0,43	0,87	2,41	2,03
79	60	0,16	0,31	0,18	0,35	1,92	1,93
71	50 (aber langsamer)	0,26	0,61	0,28	0,69	2,32	2,48
Mittelwerte		0,24	0,58	0,36	0,92	2,34	2,80

Tabelle 7
Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von NHS-Spermien in phys. Kochsalzlösung
unter Zusatz von 1 % isot. Phosphatpuffer

lebende Spermien %	Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml					Milchsäure- quotient
	Fructoseverbrauch aerob	Fructoseverbrauch anaerob	Milchsäurebildung aerob	Milchsäurebildung anaerob	Fructose- quotient	
85	0,26	0,64	0,40	0,90	2,47	2,25
78	0,45	1,10	0,41	1,51	2,46	3,68
70	0,31	0,71	0,31	0,92	2,30	2,98
75	0,55	0,99	0,66	1,47	1,77	2,26
80	0,41	1,22	0,50	1,87	2,96	3,61
75	0,51	0,82	0,51	1,23	1,62	2,41
Mittelwerte	0,42	0,91	0,47	1,32	2,26	2,90

Die in den Tabellen 3, 5 und 7 angeführten Werte sind als Parallelansätze untereinander vergleichbar.

Tabelle 8

Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von Ampullenspermien in phys. Kochsalzlosung
unter Zusatz von 1% isot. Phosphatpuffer

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

lebende Spermien %	Motili- tät %	Fructoseverbrauch		Milchsäurebildung		Fructose- quotient	Milchsäure- quotient
		aerob	anaerob	aerob	anaerob		
79	30	0,64	1,02	0,97	1,69	1,63	1,75
70	30	0,46	1,20	0,45	1,62	2,61	3,56
61	30	0,41	1,22	0,49	1,87	2,62	3,59
72	30	0,56	1,22	0,61	1,59	2,17	2,60
68	30	0,32	0,51	0,34	0,65	1,60	1,92
62	30	0,46	0,89	0,70	1,06	1,50	1,52
Mittelwerte		0,48	1,01	0,59	1,41	2,10	2,49

Die in den Tabellen 4, 6 und 8 angeführten Werte sind als Parallelsätze untereinander vergleichbar.

Zur besseren Übersicht sind die Mittelwerte der Tabellen 3 - 8 in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9

Stoffwechselleistungen von NHS- und Ampullenspermien in phys. Kochsalzlg., isoton, Phosphatpuffer 0,5% und 1% in phys. NaCl-Lösung. Zusatz von 50 mg% Fruktose.

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml (Mittel)

	NHS-Spermien			Ampullenspermien		
	NaCl	Phosphatzusatz		NaCl	Phosphatzusatz	
		0,5%	1%		0,5%	1%
Fruktoseverbrauch						
aerob	0,20	0,19	0,42 ^x	0,26	0,24	0,48 ^x
Fruktoseverbrauch						
anaerob	0,53	0,54	0,91 ^x	0,58	0,58	1,01 ^x
Milchsäurebildung						
aerob	0,27	0,27	0,47 ^x	0,27	0,36	0,59 ^x
Milchsäurebildung						
anaerob	0,82	0,84	1,32 ^x	0,81	0,92	1,41 ^x

^x Die Unterschiede zwischen diesen Werten und den jeweiligen Kontrollen (phys. NaCl-Lösung ohne Phosphatzusatz) sind bei einer Zufallswahrscheinlichkeit von $2\alpha < 0,05$ gesichert.

Da eine Erniedrigung des Sauerstoffverbrauches bei NHS-Spermien und Ampullenspermien erst nach einem Zusatz von 20% Phosphat eintritt, die stimulierende Wirkung der Phosphationen auf die Fruktolyse jedoch schon bei einem Phosphatzusatz von 1% erfolgt, wirken die dazwischenliegenden Phosphationenkonzentrationen im Sinne einer Hemmung des Pasteur-Effektes.

Der absolute Pasteur-Effekt ist definiert als Differenz aus anaerober und aerober Milchsäurebildung. Der prozentuale Pasteur-Effekt ist diese Diffe-

renz in Prozent der anaeroben Milchsäurebildung. Letzterer bringt für die Phosphatkonzentration von 1% in phys. NaCl-Lösung (entsprechend $1,25 \times 10^{-3}$ m) die Hemmung des Pasteur-Effektes besonders zum Ausdruck.

Nachstehende Tabelle soll dies verdeutlichen.

Tabelle 10

Absoluter und prozentualer Pasteur-Effekt bei NHS- und Ampullenspermien in phys. NaCl-Lösung sowie 0,5% und 1% Phosphatzusatz (in phys. NaCl-Lösung)

	Konzentr.	NHS-Sp.	Amp.Sp.
Absoluter	{ NaCl	0,55	0,54
	{ $6,25 \times 10^{-4}$ m	0,57	0,56
Pasteur-Effekt	{ $1,25 \times 10^{-3}$ m	0,85	0,82
Prozentualer	{ NaCl	67,2	66,7
	{ $6,25 \times 10^{-4}$ m	67,9	60,9
Pasteur-Effekt in %	{ $1,25 \times 10^{-3}$ m	64,4	58,2

II. Gehalt an Gesamtphosphat im NHS- und Ampullen-sperma

Da aus den vorangegangenen Versuchen eine mögliche Bedeutung der Phosphationen für die Spermienaktivierung ersichtlich war, sollten nun Anhaltspunkte gewonnen werden, inwieweit diese in vitro-Befunde für die in vivo-Verhältnisse charakteristisch sein könnten.

Tatsächlich zeigte sich (Tab. 11), daß die Werte für Gesamtphosphat im Inhalt von Samenleiterampulle signifikant ($2\alpha < 0,05$), und zwar rund 30% höher lagen als im Nebenhodenschwanz.

Tabelle 11

NHS-Sperma			Ampullensperma	
Ges. phos. ,	γ P/ml	mg%	γ P/ml	mg%
	322,0	98,5	484,0	148,2
	351	107,4	400	122,5
	370	113,3	550	168,3
	438	134,0	437	133,8
	353	108,0	488	149,5
	380	116,4	483	147,8
	344	105,5	490	150,0
	320	98,2	440	134,9
			422	129,0
Mittel		110,16		142,66
molar		$3,79 \times 10^{-3}$		$4,91 \times 10^{-3}$

III. Fruktolyse bei verschiedenem pH-Wert

Um den bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration eventuell auftretenden verschiedenen Wirkungsgrad der Phosphationen erfassen zu können, und um den geringgradigen Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration zwischen NHS- und Ampullenmilieu berücksichtigen zu können, wurden Fruktolyse-Ansätze vergleichsweise bei pH 6,0 und 6,5 in phys. NaCl mit 2,8% Phosphatzusatz (errechnet sich aus; 0,125 m, das ist die isotonische Konzentration, und 0,0035 m, das ist die durchschnittliche molare Konzentration der Phosphationen im Nebenhoden) mit NHS- und Ampullenspermien geprüft (s. Tab. 12).

Es zeigte sich, daß die Unterschiede in der Wasserstoffionenkonzentration, wie sie auch zwischen Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle gegeben sind, keinen Einfluß auf die Wirkung der Phosphationen haben. In keinem der durchgeführten Versuche wurde ein nennenswerter Unterschied

in den Stoffwechselleistungen der einander entsprechenden Ansätze mit pH 6,0 bzw. 6,5 festgestellt.

Tabelle 12

Fructoseverbrauch und Milchsäurebildung von NHS-Spermien (in NaCl-Lösung 0,9%) unter Zusatz von 2,8% Phosphatpuffer bei pH 6,0 und 6,5.

Angaben in $\mu\text{Mol}/10^8$ Spermien/ml

pH	Fructoseverbrauch		Milchsäurebildung		Fructose- quotient	Milchsäure- quotient
	aerob	anaerob	aerob	anaerob		
6,0	0,33	0,80	0,54	1,78	2,45	3,32
6,5	0,33	0,83	0,52	1,76	2,49	3,39
6,0	0,47	1,12	0,54	1,70	2,38	3,15
6,5	0,48	1,14	0,55	1,73	2,48	3,18
6,0	0,56	1,10	0,66	1,85	1,98	2,80
6,5	0,55	1,10	0,67	1,85	2,00	2,78
6,0	0,51	1,27	0,60	1,98	2,49	3,30
6,5	0,52	1,28	0,61	2,01	2,47	3,28
Mittel:						
6,0	0,47	1,07	0,59	1,83	2,32	3,14
6,5	0,47	1,09	0,59	1,86	2,34	3,18

E. DISKUSSION

Unsere Befunde (Tab. 9) zeigen, daß Phosphationen schon in einer Konzentration von $1,25 \times 10^{-3}$ m eine Steigerung der aeroben, in geringerem Ausmaß auch der anaeroben Glykolyse von Ampullen- und NHS-Spermien bewirken. Da die Atmung der Spermien erst bei $2,55 \times 10^{-3}$ m gehemmt ist, ergibt sich für den dazwischenliegenden Konzentrationsbereich eine echte Hemmung des Pasteur-Effektes. Dies kommt besonders klar in der Abnahme des prozentualen Pasteur-Effekts (Tab. 10) zum Ausdruck, der das beste Maß für den Pasteur-Effekt darstellt.

Die beschriebene Wirkung der Phosphationen auf den Stoffwechsel der Spermien ist besonders interessant im Hinblick auf die Theorie des Pasteur-Effekts nach LYNEN und JOHNSEN (s. NETTER, 1959), die zur Zeit als die am besten gestützte Theorie dieses zellulären Regulationsvorgangs gilt. Danach kommt dieser dadurch zustande, daß die Atmung in den Mitochondrien und die Glykolyse im Cytoplasma um das anorganische Phosphat als gemeinsames Substrat konkurrieren, das sie für die Phosphorylierungen benötigen. Eine Erhöhung der Atmung bewirkt gesteigerten Verbrauch an Phosphat, das nun nicht mehr im gleichen Ausmaß zur Glykolyse zur Verfügung steht; Es resultiert die beobachtete Glykolysehemmung. (Nach anderen Autoren ist die Konzentration an ADP geschwindigkeitsbestimmend für den Stoffwechsel der Zelle.) Die von uns beobachtete hemmende Wirkung der Phosphationen auf den Pasteur-Effekt ist durchaus im Sinne dieser Theorie, da ja nun das zugesetzte Phosphat zusätzlich für Atmung und Glykolyse zur Verfügung steht.

Da nach LARDY zur Erzielung einer halbmaximalen Atmung die Phosphationenkonzentration in den Mitochondrien etwa 2×10^{-3} m sein muß, liegt die von uns in NHS- bzw. Ampullensperma festgestellte Phosphatkonzentration in einem Bereich, in dem durch weiteren Phosphatzusatz noch eine Steigerung des Stoffwechsels zu erwarten ist.

Die Hemmung des Pasteur-Effekts der Spermien stellt nach LARDY ein Kriterium für die Reifung dar. Es fragt sich nun, ob Phosphationen auch in vivo für die Stoffwechselumstellung der Spermien auf dem Weg vom Nebenhodenschwanz zur Ampulle verantwortlich zu machen sind.

Das von uns bestimmte Gesamt-Phosphat (Tab. 11) liegt in der Ampulle um ca. 30% konzentrierter vor als im Nebenhodenschwanz. Die Möglichkeit, daß Phosphationen in der Ampulle infolge des hier etwas mehr in den sauren Bereich verschobenen pH-Wertes eine andere Wirkung entfalten, möchten wir allerdings durch den in Tab. 12 beschriebenen Versuch verneinen.

Von verschiedenen Autoren wurde bei den Spermien beim Eintritt in den vas deferens eine Erhöhung der Permeabilität der äußeren Membran beobachtet; von SALISBURY wird dies zur Erklärung der Spermienreifung herangezogen (s. dazu S. 8). Man konnte sich nun vorstellen, daß dadurch die in der Samenleiterampulle ohnehin etwas konzentrierteren Phosphate leichter an den Ort ihrer Wirkung gelangen. Unsere Versuche zeigten allerdings, daß durch Zusatz von Phosphat-Ionen auch bei NHS-Spermien eine Erhöhung der Glykolyse auftritt.

NEWTON und ROTHSCCHILD (1961) stellten eine größere Menge labiler Phosphatverbindungen in den Spermien fest. In unserem Labor (SCHAMS 1964, unveröffentlichte Versuche) wurde beobachtet, daß der Gehalt an freiem Phosphat in der Ampulle und im Nebenhodenschwanz unmittelbar nach der Gewinnung keine Unterschiede aufwies, in den Ampullen - im Gegensatz zum Nebenhodenschwanz - jedoch beim Liegenlassen über mehrere Stunden anstieg. Dies spricht für die Anwesenheit von Phosphatasen bereits im Ampullensekret. Es wäre somit noch die Möglichkeit zu erwägen, daß Phosphatasen in die Zelle eindringen, hier die Phosphatverbindungen angreifen und somit die Phosphatkonzentration in der Zelle erhöhen.

Daß die bereits oben erwähnte Steigerung der Permeabilität gerade in der Samenleiterampulle Ausmaße erreicht, die den Durchtritt hochmolekularer Enzyme ermöglicht, konnte unlangst von WALDSCHMIDT, KARG und HOFFMANN (1963) am Beispiel des Chymotrypsins nachgewiesen werden.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Spermien aus Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle von Bullen wurden im Hinblick auf den Stoffwechsel unter bestimmten in vitro-Bedingungen untersucht. Als Kriterium wurden Atmung, sowie aerobe und anaerobe Fruktolyse und Milchsäurebildung erfaßt. Als Inkubationslösungen dienten phys. Kochsalzlösung sowie verschiedene isotonische Phosphatpuffer-Konzentrationen in phys. Kochsalzlösung.

Eine Hemmung der Atmung von Nebenhodenschwanz- und Ampullen-spermien trat erst bei Zusatz von 20% Phosphatanteil in der Inkubationslösung auf. Dagegen wirkte ein Zusatz von 1% Phosphatpuffer schon deutlich stimulierend auf Fruktoseverbrauch und Milchsäurebildung. Phosphat-Ionen in dem dazwischenliegenden Konzentrationsbereich bewirken somit eine echte Hemmung des Pasteur-Effekts.

Der Gehalt an Gesamt-Phosphat im Ampullenmilieu ist durchschnittlich um 30% höher als im Nebenhodenschwanz-Inhalt. Es wird die mögliche Bedeutung von Phosphat-Ionen bzw. Phosphatasen für die durch eine Hemmung des Pasteur-Effektes gekennzeichnete Spermienreifung erörtert.

G. LITERATURVERZEICHNIS

Barker, S.B., W.H. Summerson, 1941

"The colorimetric determination of lactic acid in biological material"

J. Biolog. Chem. 138, 535

Bialy, G., V.R. Smith, 1959

"Cold choc of epididymal spermatozoa"

J. Dairy Science 42, 2002

Bonadonna, T., G.C. Pozzi, 1955

Zootec. Vet. 10, 93

Zit. nach Leidl und Berchtold 1961

Bratton, C., 1946

"Physiology and morphology of spermatozoa from different levels of the reproductive tract of the bull"

Master of Sci. Thesis, Cornell Univers.,

Zit. Salisbury and Van Demark 1961

Brüggemann, J., M. Waldschmidt, H. Karg, D. Schams, 1963

"Beiträge zur Physiologie der Reifung und des Alterns von Spermien"; II. Mitteilung

Zentralblatt f. Veterinärmedizin 10, 463

Dawson, R.M.C., T. Mann, I.G. White, 1957

"Glyzerylphosphorylcholin and phosphorylcholin in semen and their relation to cholin"

Biochem. J. 65, 627

Fiske, SubbaRow, 1925

J. Biol. Chem. 66, 375

Zit. nach "Methods in Enzymology" 1957

Bd III, S. 840

Gassner, F.X., M.L. Hopwood, 1953

In "Mammalian germ cells", Ciba foundation
symposium,
Little, Brown and Co., Boston, S. 18

Geigy, I.R., AG, 1960

"Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen",
6. Auflage

Gosh, D., H. Lardy, 1952

"The nature of a Yeast-stimulating agent in
mammalian spermatozoa"
J. Animal Sci. 11, 545

De Groot, B., 1961

"Ageing of bull sperms at the end of the passage
through the epididymis"
J. of Reproduct. a. Fertility 2, 107

Hartree, E.F., T. Mann, 1959

"Plasmalogen in ram semen, and its in sperm
metabolism"
Biochem. J. 71, 423

Karg, H., F.X. Gassner, 1961

Tätigkeitsbericht des IV. Inter. Kongresses über
Fortpfl. d. Tiere, Den Haag, S. 256

Lardy, H.A., 1953

"Factors controlling rates of metabolism in
mammalian spermatozoa"
Mammalian Germ Cells, Ciba Found. Symp.
Little, Brown a. Co., Boston, S. 59

Lardy, H.A., D. Ghosh, G.W.E. Plaut, 1949

"A metabolic regulator in mammalian spermatozoa"
Science 109, 366

- Lardy, H.A., P.H. Phillips, 1941
"Phospholipids as a source of energy for motility
of bull spermatozoa"
Amer. J. Phys. 134, 542
- Lardy, H.A., R.G. Hansen, P.H. Phillips, 1945
"The metabolism of bovine epididymal spermatozoa"
Arch. Biochem. 6, 41
- Lasley, J.F., R. Bogart, 1944
"A comparative study of epididymal and ejaculated
spermatozoa of the boar"
J. Animal Sci. 3, 360
- Leidl, W., M. Berchtold, 1961
"Zur Frage der Spermieeinlagerung in Samen-
leiter und Samenleiterampulle beim Bullen"
Berl. Münchner Tierärztl. Wochenschr. 74, 305
- Mann, T., 1946
"Studies in the metabolism of semen"
Biochem. J. 40, 481
- Mann, T., 1948
"Fructose content and fructolysis in semen"
J. of Agricultural Sci. 38, 323
- Mann, T., 1948
"Fructose and fructolysis in semen in relation to
fertility"
Lancet 254, 446
- Mann, T., 1954
"The Biochemistry of Semen"
Methuen a. Co., London

Mann, T., 1957

"Über die Biochemie des Samens"
Zuchth., Fortpfl. und Bes. d. Haust. 1, 138

Mann, T., 1964

"Biochemistry of semen and of the male
reproductive tract"
Methuen a. Co. Ltd., London, S. 19

Netter, H. 1959

"Theoretische Biochemie"
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und
Heidelberg, S. 656

Newton, A.A., Lord Rothschild, 1961

"Energy-rich phosphate compounds in bull semen:
comparison of their metabolism with anaerobic
heat production and inpendance change frequency"
Proceesings of the Royal Society, 155, 183

Nickel, R. A. Schummer, E. Seiferle, 1960

"Lehrbuch der Anatomie der Haustiere" Bd. II,
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Rauen, 1956

"Biochem. Taschenbuch"
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg

Redenz, E., 1933

"Über den Spaltungsstoffwechsel der Säugetier-
spermatozoen im Zusammenhang mit der Beweg-
lichkeit"
Biochem. Zeitschr. 257, 234

Risley, P.L., C. Turbyfill, 1957

"Studies in vivo of the contractile behaviour of
the epididymis"
Anat. Rec. 128, 607

Rödel, L., 1955

"Beitrag zum Mechanismus der Spermienreifung im Nebenhoden"

Fortpfl., Zuchth. und Haustierbes. 5, 1

Salisbury, G.W., 1957

"The function of the epididymis of the bull.

I. A theory for the activation of spermatozoan activity"

Tijdschr. Diergeneeskunde 13, 1

Schams, D., 1964

"Untersuchungen über den Stoffwechsel von Spermien aus Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle von Bullen"

Diss.med.vet. München, S. 23

Scott, T.W., R.M. Dawson, 1963

"Phospholipid interrelationships in rat epididymal tissue and spermatozoa"

Biochem. J. 87, 507

Scott, T.W., J.G. Wales, J.C. Wallace, I.G. White, 1963

"Composition of ram epididymal and testicular fluid and the biosynthesis of glyceryl-phosphorylcholine by the rabbit epididymis"

J. Reprod. Fertil. 6, 49

Swanson, E.W., J.J. Bearden, 1951

"An eosin-nigrosinstain for differentiating live and dead bovine spermatozoa"

J. Animal Sci. 10, 981

Waldschmidt, M., H. Karg, D. Schams, 1963

"Beiträge zur Physiologie der Reifung und des Alterns von Spermien"; I. Mitteilung

Zentralblatt für Veterinärmed. 10, 1

Van der Waerden, B.L., 1957

"Mathematische Statistik"

Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg

White, I.G., J.C. Wallace, G.M. Stone, 1964

"The metabolism of seminal GPC by fluids of the female reproductive tract"

Bericht üb. den V. Int. Kongreß üb. die tier.
Fortpflanzung und die künstl. Besamung, Trient,
Bd. IV, S. 526

White, I.G., R.G. Wales, 1961

"Comparison of epididymal and ejaculated semen
of the ram"

J. Reprod. Fertil. 2, 255

Young, W.C., 1929

"A study of the function of the epididymis"

J. Morphol. 47, 479.

Dem Vorstand des Instituts für Physiologie und Ernährung der Tiere der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Professor Dr. Dr. Johannes BRÜGGEMANN, erlaube ich mir für die großzügige Unterstützung und Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten besonderen Dank zu sagen.

Mein Dank gilt auch Fräulein Dr. rer. nat. M. WALDSCHMIDT sowie Herrn Universitätsdozenten Dr. H. KARG für wissenschaftliche Anregungen.

LEBENS LAUF

Am 10. Oktober 1938 wurde ich, Manfred Kleemann, als Sohn des Architekten Friedrich Kleemann und seiner Ehefrau Karolina in Wassertrüdingen/Mfr. geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich in die Oberrealschule Nördlingen über, an der ich im Sommer 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1958/59 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Universität München und beendete es mit der Tierärztlichen Prüfung im Februar 1964.

